**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DU LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

**UNIVERSITE YAHIA FARES DE MEDEA**

Faculté de Technologie

Département de Génie des Procédés et Environnement




**Mémoire de fin d'études pour l'obtention du Diplôme de Master**

Filière : **Génie des procédés**

Spécialité : **Génie Des Procédés De L' Environnement**

# Etude de l'influence d'un tensionactive sur la dépollution des eaux

**Présenté par** :

- Selama houda
- Ghefferi samira

**Encadré par** :

Dr.Farhat Samira

Mme .Mihoubi Nadia

**Promotion 2020/2021**

# Remerciement

***Au terme de ce modeste travail, nous tenons à exprimer notre profonde et nos vifs remerciements :***

***Avant tout, nous remercions ALLAH pour nous avoir donné la force et la patience pour mener à terme ce travail.***

***A nos parents qui nous ont toujours encouragés et soutenus durant toutes nos études.***

***A notre promotrice Dr.Mme FARHAT SAMIRA et a notre co-promotrice Mme MIHOUBI NADIA, chaque une pour sa disponibilité et l'aide***

***Précieuse qu'il nous a offert pour l'élaboration de ce travail.***

***A tous les enseignants du département de Génie de Procédé Environnement.***

# *Dédicace*

***Je dédie ce mémoire :***

***A mes parents qui n'ont jamais cessé de ménager leurs efforts***

***Pour attenidre ce niveau . Leur sacrifices , consiels***

***Et patience,  compréhension et encouragements***

***A toutes et tous, ceux qui étaient la pour moi , avec leur présence et appui***

***Jamais de simples mots me permerttront de vous exprimer  mes Remerciements .***

***A ma grand famille , grand et petits .***

***A mes amis.***

***SELAMA-HOUDA.***

# *Dédicace*

***Je dédie ce mémoire :***

***A mes parents qui n'ont jamais cessé de ménager leurs***

***efforts***

***Pour attenidre ce niveau . Leur sacrifices , consiels***

***Et patience,  compréhension et encouragements***

***A toutes et tous, ceux qui étaient la pour moi , avec leur***

***présence et appui***

***Jamais de simples mots me permettront  de vous exprimer mes Remerciements .***

***A ma grand famille, grand et petits .***

***A mes amis.***

***GHAFFARI-SAMIRA***

# Sommaire

**Sommaire** .....
**Liste de figure** .....
**Liste des tableaux** .....
Liste des abréviations.....
**Abstract** .....
**Introduction Générale**..... 1
chapitre I : Biosurfactant ..... 2
I.1. Introduction..... 2
I.2. Définition des Surfactants..... 2
I.2.1. Les biosurfactants..... 4
I.3. Structures microbienne ou biosurfactants ..... 5
I.4. Classification des biosurfactants..... 6
I.5. Production des biosurfactants ..... 7
I.5.1. Les substrats carbonés..... 9
I.5.2. Microorganismes producteurs..... 14
I.5.3. Etude de la croissance bactérienne..... 15
I.6. Paramètres influençant la production..... 16
I.6.1. Influence de la source de carbone ..... 16
I.6.2. Influence de l'azote..... 16
I.6.3. Influence du pH..... 17
I.6.4. Influence des sels minéraux ..... 17
I.6.5. Influence de l'oxygène..... 17
I.6.6. Influence de la vitesse d'agitation..... 17
I.7. Propriétés physico-chimique des biosurfactants ..... 17
I.7.1. Caractéristiques physiques des biosurfactants ..... 17
I.7.2. Concentration micellaire critique (CMC) ..... 18
I.7.3. Caractéristiques techniques excellentes ..... 19
I.7.4. Stabilité thermique et chimique ..... 19
I.7.5. Caractéristiques écologiques..... 19
I.8. Extraction des biosurfactants du milieu de croissance..... 19
I.9. Rôle des biosurfactants pour la bactérie..... 20
I.10. Utilisation des biosurfactants..... 21

# [Sommaire]

I.11. Modes d'action ..... 21
I.11.1. Mobilisation ..... 21
I.11.2. Solubilisation ..... 22
I.12. Conclusion ..... 22
chapitre II : Matériels et Méthodes ..... 23
II.1. Matériels Utilisés dans les expériences ..... 23
II.2. Réactifs utilisés ..... 24
II.3. Micro-organismes utilisés ..... 25
II.3.1. Caractérisation de la souche marinobacter hydrocarbonoclasticus ..... 25
II.3.2. Caractérisation de la souche Kp ..... 26
II.4. Production du biosurfactants ..... 27
II.4.2. Préparation du milieu de production (MM) ..... 28
II.5. Mode opératoire ..... 29
II.6. Suivi de la Production du biosurfactant ..... 31
II.6.1. Mesure de la DO ..... 31
II.6.2. Test de déplacement d'huile ..... 31
II.6.3. Indice d'émulsification ..... 32
II.6.4. Extraction et purification partielle du biosurfactant ..... 32
II.7. Caractérisation du biosurfactant ..... 34
chapitre III : Résultats et Discussion ..... 35
III.1. la production de biosurfactant ..... 35
III.2. Mesure de la DO ..... 35
III.2.1. Test de de placementde huile (DDH) ..... 35
III.2.2. Détermination de l'indice d'emulsion $E_{24}$ ..... 36
Conclusion Générale ..... 42
**Référence bibliographie** .....

# Liste de figure

Figure I-1: Surfactant avec des groupements apolaires (hydrophobe) et polaire (hydrophile). ..... 3
Figure I-2:Tension superficielle en fonction de la concentration en agent tensioactif chimique ou naturel, et détermination de la CMC (concentration micellaire critique).[5] ..... 4
Figure I-3:Représentations les plus utilisées pour illustrer les deux parties (hydrophile et hydrophobe) des molécules amphiphiles des agents de surfaces [11]. ..... 5
Figure I-4: Test de l'indice d'émulsif..... 9
Figure I-5: Composition (%) du gazole en différents hydrocarbures D'après Durant, 1998. ..... 10
Figure I-6 : Variation de certaines proprietés physiques en fonction de la concentration du tensio-actife autour de la CMC [27]. ..... 18
Figure II-1: Forme des colonies de la souche SdK644 cultivée dans le milieu LB, après 48h d'incubation.[35] ..... 26
Figure II-2 : Aspect de la Klebsiella pneumoniae..... 26
Figure II-3 :Les Composants du milieu LB..... 27
Figure II-4: milieu L.B préparation de l'inoculum ..... 27
**Figure II-5**:Ajustement du pH ..... 29
**Figure II-6 :** Structure chimique de l'acétamipride. ..... 30
**Figure II-7:** répartition du milieu MM dans les flacons. ..... 31
Figure II-8: Testde l'indice d'émulsification ..... 32
Figure II-9: Extraction du biosurfactants. ..... 33
Figure II-10: Les équipements d'infrarouge IR ..... 34
Figure III-1: Test de deplacementde huile d'olive..... 36
Figure III-2: Test de DDH ..... 36
Figure III-3: Test s'emilsification..... 37
Figure III-4: Spectre de IR du biosurfactant de la souche sdk644..... 39
Figure III-5: Spectre de IR du biosurfactant de la souche K.P ..... 41

# Liste des tableaux

Tableau I-1: Sources microbiennes des classes majeures des biosurfactants et réduction de la tension de surface [1]. ..... 6
Tableau I-2: Principales caractéristiques physico-chimiques du gazole [17]..... 10
Tableau I-3: Composition en acides gras d'une huile de tournesol « fraîche » (HTf) et d'une huile de tournesol résiduelle de friture HTRF [18] ..... 12
Tableau I-4: Principales caractéristiques physico-chimiques de l'huile d'olive [19]..... 13
Tableau I-5 : Composition moyenne en acides gras dl'huile d'olive[19] ..... 14
Tableau I-6: les méthodes communes employées dans la récupération de biosurfactants[29]. ..... 20
Tableau I-7: Utilisations potentielles des biosurfactants[2] ..... 21
**Tableau II-1**:Matérieles utilisés ..... 23
Tableau II-2:Réactifs chimiques utilisés ..... 24
**Tableau II-3** : composition du milieu MM. ..... 28
Tableau II-4:Solution oligo-eléments..... 28
**Tableau II-5** : Caracteristiques chimiques du pesticide utilisé ..... 30
Tableau III-1: mesure de DO..... 35

# Liste des abréviations

**AND :** Acide Désoxyribonucléique

**C/N** : Rapport de carbone sur l'azote

**C°:** Celsuis

**CMC :** Concentration Micellaire Critique .

***Cp** :Centipiose

**DDH :** Déplacement d'huile

**DO :** Densité Optique

**E24 :** Indice d'émulsification

**EK :** Embryon Kidney

**LB :** Lauria Bertani

**MM :** milieu minéraux

**m N/m :** Milli Newton par Métre

**pH :** Potential de hydrogéne

**TS :**Tension de surface

**UV :** Lumiére ultra-violette

**v/v :** Rapport volume/volume

## Resumé :

Les surfactants sont des agents à activité de surface synthétisés chimiquement ou par voie biologique (biosurfactant).

Ces molécules sont principalement produites par des microorganismes qui se développent de manière aérobie dans un milieu contaminé contenant une ou plusieurs sources de carbone

Les biosurfactants constituent une classe de molécules biologiques ayant divers intérêts dans plusieurs domaines, allant de l'industrie agro-alimentaire, chimique, cosmétique, pharmaceutique…etc, à l'application dans domaines plus critiques ; biomédicale et thérapeutique.

L'objectif de notre travail est la production et la caractérisation de biosurfactants en utilisant des bactéries isolants ( sdk 644, keepsiella pneumonia) produit de l'hopital medea.

Pour cela, il ya une criossance du milieu MM additionné de 1% d'huile olive comme source de carbone a été réalisée et incubée .

Plusieurs paramètres ont fait l'objet d'un suivi régulier à savoir : le pH, la densité optique (DO) et test de déplacement d'huile (DDH) ce qui nous permis de comparer les souches par apport à leur capacité de production de biosurfactant.

Les bio surfactants bassaient sur les métodes de l'extraction et centrifugation ,les séchages dans l'étuves.



**Mots clés** :bio surfactant ,extraction , diamètre de déplacement d'huile, centrifugation.



## Abstract

Surfactants are surface active agents chemically or biologically synthesized. These molecules are mainly produced by microorganisms that grow aerobically in a contaminated environment containing one or more carbon sources.

Biosurfacts constitute a class of biological molecules having various interests in several fields, ranging from the agro food industry, chemical, cosmetic, para pharmaceutical...etc., to the application in more critical areas such as biomedical and therapeutic.

The objective of our work is the production and characterization of biosurfactants using pure bacteria from sdk 644,keepsiella pneumonia produced from Medea Hospital .

For this, a fermentation on MM environment supplemented with 1% of oliv oïl as carbon source was performed and incubated , parameters were regularly monitored such as : pH, optical density (DO) and oil displacement test ( DDO ), which allowed us to compare the strains compared to their production capacity of biosurfactant.

The biosurfactant based on the extraction and centrifugation methods, drying in the oven.

**Key Words** : biosurfacts , extraction , oïl deplacement diameter ,centrifugation .

**الملخص:**

السرفكتونات هي العوامل السطحية النشطة المنتجة كيميائيا او بيولوجيا(السرفكتونات الحيوية ). يتم إنتاج هذه الجزيئات بشكل رئيسي عن طريق الكائنات الدقيقة التي تنمو هوائيا في وسط ملوث يحتوي على مصدر كربون او اكثر.

تشكل السرفكتونات الحيوية فئة من الجزيئات البيولوجية ذات أهمية مختلفة في العديد من المجالات،والتي تتروا من صناعة الاغذية الزراعية ،المواد الكيميائية ،مستحضرات التجميل، المستحضرات الصيدلائية .... الخ الى التطبيقلت في المجالات الاكثر اهمية الطبية الحيوية العلاجية.

الهدف من عملنا هو إنتاج وتوصيف السرفكتونات الحيوية باستخدام البكتريا النقية الناتجة من مستشفى المدية.

ومن خلال دلك تم تكاثر البكتريا في وسط مغذي معدني مزود ب1%من الزيت الزيتون كمصدر للكربون وقد تم الاستخلاص عند 30درجة مئوية و 150 دورة في الدقيقة.

تم رصد العديد من المعاير بانتظام: ، الكثافة البصرية واختيا رازاحة زيت الزيتون مما سمح لنا بمقارنة السلالاتين من خلال المساهمة في قدرتها الانتاجية للسرفكتونات الحيوية .

انتاج السرفكتونا ت عامل خافض للتوتر السطحي يعتمد على طرق الاستخلاص والطرد المركزي و التجفيف.

**الكلمات المفتاحية :** السرفكتونات، الاستخلاص،اختبار الازاحة الزيت ، الطرد المركزي .

# *Introduction générale*

## Introduction Générale

Les biotechnologies sont un domaine très actuel d'application de la biologie fondamentale et constituent la résultante d'interactions entre progrès d'un large éventail de connaissances et progrès des méthodes en vue de produire des substances à haute valeur ajoutée.

Les micro-organismes sont capables d'effectuer une grande diversité de réactions chimiques qui se traduisent soit par la production de biomasse, c'est-à-dire de corps cellulaires, soit par la production ou la transformation de substances organiques.

Une souche microbienne possède ses caractères propres liés à son patrimoine génétique et à ses systèmes de régulation : il s'agit alors de la placer dans des conditions telles qu'elle puisse exprimer le maximum de ses potentialités.

Notre étude s'inscrit dans ce cadre et concerne la production de *Biosurfactants* par différents genres bactériens ***marinobacter hydrocarbonoclasticus sdk644 et klepssiella pneumonia.***

Les *bio surfactants* sont des substances tensioactives d'origine biologique synthétisées par divers micro-organismes durant leur cycle de croissance.

Ce sont des molécules amphiphiles constituées d'une partie hydrophile polaire et d'une partie hydrophobe apolaire. Leur propriété distinctive est de pouvoir modifier les caractéristiques des interfaces des systèmes polyphasiques dans lesquels ils sont introduits, en réduisant les tensions superficielles et interfaciales.

De nombreux agents de surface d'origine biologique ont été produits; leur nature, tout comme leur pouvoir tensioactif, sont fortement dépendants des micro-organismes utilisés, ainsi que des substrats nutritifs disponibles pour le développement cellulaire.

Parmi les différents biosurfactants recensés, on trouve aujourd'hui, les glycolipides, les lipopeptides, les phospholipides, les lipopolysaccharides, des lipides neutres ou des acides gras.

Tout comme leurs homologues chimiquement synthétisés, ils ont des propriétés émulsifiantes, moussantes, mouillantes ou encore dispersantes; ils expriment aussi des propriétés plus spécifiques, antimicrobiennes notamment.

# Synthèse bibliographique

# chapitre I : Biosurfactant

## I.1.Introduction

Les surfactants d'origine microbienne font l'objet de nombreuses études, l'attention portée aux problèmes d'environnement les faisant bénéficier d'un intérêt croissant. Les surfactants sont des molécules qui possèdent une partie hydrophile qui peut être non ionique (oxydes), cationique (sels d'ammonium), anionique (sulfates), amphotère et une partie hydrophobe. Le surfactant va se trouver à l'interface de phases ayant des degrés de polarité différents, comme dans le cas des mélanges eau-huile ou air-eau. La formation d'un film moléculaire ordonné abaisse l'énergie interfaciale et est responsable des propriétés particulières des surfactants. Beaucoup de molécules biologiques possèdent ce caractère amphiphile. Les composés microbiens qui possèdent de telles propriétés sont dénommés biosurfactants.

En termes d'abaissement de tension interfaciale, de la tension de surface, de la stabilité thermique et chimique (pH), beaucoup de biosurfactants sont comparables aux surfactants synthétiques. Les biosurfactants incluent un grand nombre de structures chimiques, comme les glycolipides, les lipopeptides, les complexes polysaccharides, les protéines, les phospholipides et les acides gras. La structure la plus commune est celle des glycolipides. Les bactéries les plus utilisées dans la production de biosurfactantssont *sdk644,klepsiella pnumoniae , Pseudomonas, Rhodococcuc, Torulopsis, Bacillus, Nocardia, Serratia et Corynebacterium.* La source de carbone peut être un alcane, du glucose, du glycérol, etc. Le choix de la source de carbone joue un rôle important sur le rendement et la structure du biosurfactant.

## I.2.Définition des Surfactants

Un agent de surface ou tensioactif ou surfactant est une substance capable de modifier la tension superficielle entre deux surfaces. Les composés tensioactifs sont des molécules amphiphiles composées de deux domaines de polarités différentes: l'un hydrophile et polaire (affinité pour l'eau) et un autre hydrophobe et apolaire (affinité pour les lipides)**[1](**Figure I-1**)**. Ces composés ont la propriété de se concentrer et de s'agréger aux interfaces afin d'abaisser les tensions de surface (interfaces liquide/gars) et les tensions interraciales (liquide/solide ou liquide/liquide), tout en réduisant les forces répulsives entre deux phases différentes qui à leur tour se mélangent et s'interagissent plus facilement[**2**].

En effet, aux interfaces eau-matièregrasse, par exemple, les surfactants concentrent leur partie lipophile, comprenant généralement des acides gras saturés, insaturés ou hydrocarbonés dans le corps gras. Leur partie hydrophile, constituée par un acide aminé ou un peptide, des anions ou des cations, des mono-di-ou polysaccharides, s'immergent dans l'eau. Ces agrégats de molécules tensioactives ainsi forméss'appellent des micelles **[2].**

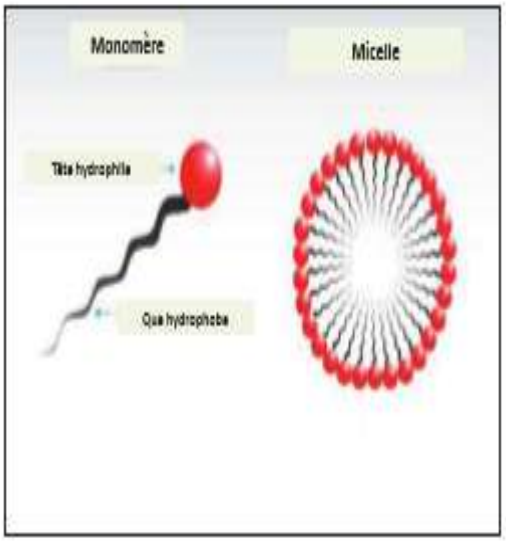



**Figure I-1:** Surfactant avec des groupements apolaires (hydrophobe) et polaire (hydrophile).

Les tensioactifs sont classés selon la nature de leur tête polaire en quatre grandes familles [**3**]: les tensioactifs cationiques chargés positivement, les anioniques dont la tête polaire est chargée négativement, les amphotères possédant à la fois une charge négative et une charge positive et les non-ioniqueLes surfactants sont parfois dénommés selon la fonction qu'ils remplissent: détergents, agents dispersants, agents de solubilisation, agents mouillants, agents émulsifiants et agents moussants **[4].** Plus la concentration de surfactant en solution est élevée, plus la tension de surface est réduite. Toutefois, à une certaine concentration de surfactants, la tension de surface atteint une valeur minimale constante, connue comme la concentration micellaire critique (CMC), qui est la concentration en tensioactif dans un milieu au-dessus de laquelle des micelles se forment spontanément (Figure I-2**)[5]**

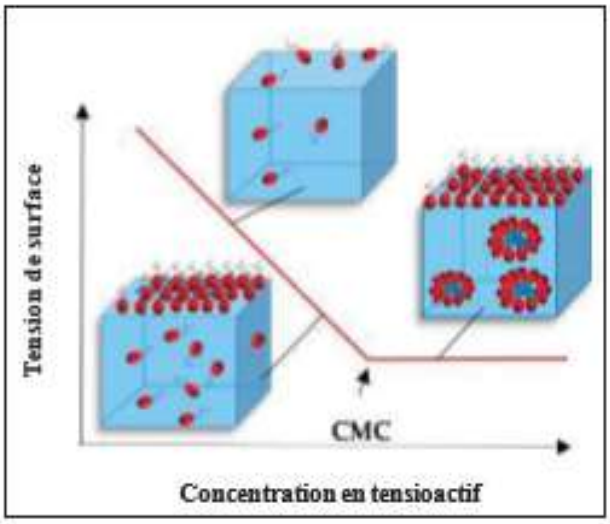



**Figure I-2**:Tension superficielle en fonction de la concentration en agent tensioactif chimique ou naturel, et détermination de la CMC (concentration micellaire critique).[5]

La production mondiale actuelle de surfactants chimiques se chiffre à plus de 18 millions de tonnes par année**[6**]. Les tensioactifs synthétiques sont des produits dérivés du pétrole et présentent 95% du marché international des surfactants en 2012 [**6**]. Ils présentent un risque pour l'environnement car ils sont toxiques et non biodégradables **[5]**C'est pour cette raison, et depuis plusieurs années, que les scientifiques se sont intéressés à des surfactants produits par des organismes vivants: les tensioactifs biologiques ou biosurfactants. Les bio tensioactifs possèdent les mêmes propriétés tensioactives que leurs homologues chimiques, mais ont l'avantage d'être biodégradables, non ou faiblement toxiques **[4].**

### I.2.1.Les biosurfactants

Les biosurfactants (ou surfactants biologiques ) sont définis comme étant des molécules amphiphiles actives aux surfaces et produites par des cellules vivantes : des levures, bactérie et champignons . leur structure dépend du type de microorganisme, de la nature du substrat et des condition de la production **[7] [8].** Ils sont capables de s'accumuler à l'interface entre deux phases non miscibles comme l'huile et l'eau, tout en réduisant la tension de surface, et par conséquent, ils permettent à celles-ci de se mélanger et d'interagir plus facilement.

## I.3.Structures microbienne ou biosurfactants

Les surfactants (SurfaceActiveAgents) sont des agents à activité de surface (tensioactifs), synthétisés chimiquement ou par voie biologique (biosurfactants)**[9].**

Le surfactant microbien ou biosurfactant est un agent de surface ou tensioactif ayant un pôle hydrophile et un pôle hydrophobe, susceptible d'être produit par une grande variété de micro-organismes.

Cette synthèse est le résultat d'une bioconversion effectuée par une souche microbienne à partir d'un substrat hydrocarbonateou carbohydraté**[10].**

L'intérêt de l'utilisation des biosurfactants vient de leurs propriétés interraciales qui sont une conséquence de leur structure moléculaire (pole hydrophile et lipophile) (Figure I-3**)** et qui leur confère un pouvoir émulsifiant **[2].**

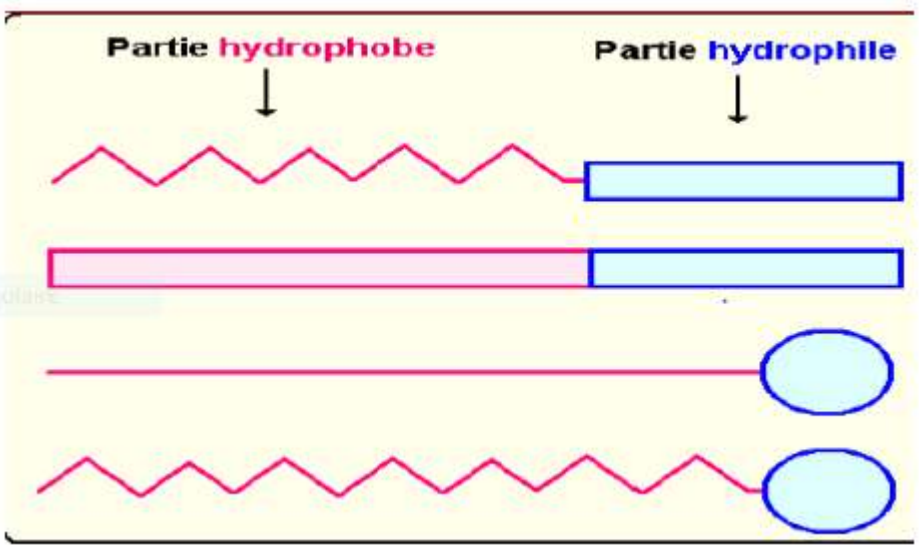



**Figure I-3:**Représentations les plus utilisées pour illustrer les deux parties (hydrophile et hydrophobe) des molécules amphiphiles des agents de surfaces [11].

## I.4.Classification des biosurfactants

Les biosurfactants sont classés suivant la nature biochimique du surfactant produit par le micro-organisme. On distingue cinq grandes classes de biosurfactants : les glycolipides, les lipopeptides, les phospholipides, les liposaccharides et les lipides neutres .

- **-Les glycolipides** : sont constitués d'hydrates de carbone en combinaison avec une longue chaîne d'acides aliphatiques ou d'acideshydroxyaliphatiques. Les glycolipides les plus étudiés sont les rhamnolipides, les tréhalolipides et les sophorolipides [12].
- **-Les lipopeptides** : sont composés d'un lipide attaché à une chaîne polypeptidique. Les lipides d'ornithine sont les plus connus .
- **-Les phospholipides** : sont formés de groupements alcool, phosphate et de chaine lipidique ,indique que bien Que prèsents dans tous les micro-organismes ,il y'a peu d'exemple de production extracellulaire.
- **Les lipopolysaccharides ou polymèrique** : sont constituès d'une ou plusieurs unités saccharides et d'acide gras .
- **-Les acides gras et lipides neutres** : sont les biosurfactants qui possédent la masse molaire la plus élvée Du fait de leur forte production et de leur propriétés tension actives importantes , les biosurfactants les plus communs et les plus étudiés sont les glycolipide et les phospholipides [2].

D'après **Lang S. et Wullbrandt D. (1996).**Ces différentes structures sont arrangées en quatre classes principales de bio -surfactants :

**Tableau I-1:** Sources microbiennes des classes majeures des biosurfactants et réduction de la tension de surface [1].

| **Biosurfactant** | **Micro-organismes** | **Tension de surface(mN/m)** |
|---|---|---|
| **Glycolipides** | | |
| Rhamnolipides | *-pseudomonasaeruginosa*<br>*-pseudomonassp* | 29<br>25-30 |
| Trehalolipides | *Rhodococcuserythropolis*<br>*-nocardiaerythropolis*<br>*-mycobactiumsp* | 32-36<br>30<br>38 |
| Sophorolipide | *-torulopsis- bombicola* | 33 |

| | | |
|---|---|---|
| | *-torulopsis-petrophlum* | 30 |
| **Mannosylerythritolipides (MELs)** | *-Pseudozyme-chirashimaensis -pseudozyme-hubeiensis* | 29.2 |
| Lipopeptides et lipoprotèines | | |
| Peptide-liquide | *Bacilluslicheniformis* | 27 |
| Serrawettine | *Serreatiamarcescens* | 20-33 |
| Viscosine | *Pseudomonasfluerescens* | 20.5 |
| Surfactine | *Bacillus subtilis* | 27-32 |
| Subtiline | *Bacillus subtilis* | |
| **Acides gras et phospholipides** | | |
| **Acides gras** | *Corynebacteriumiepis* | 30 |
| **Phospholipides** | *Thiobacilusthiooxdans* | |
| **Biosurfactantspolymétriques** | | |
| Emulsan | *Acinetobactercalcoaceticus* | |
| Biodispersan | *Acinetobactercalcoaceticus* | |
| Mannan-lipide-protéine | *Candida tropicalis* | |
| Liposan | *Condidalipolytica* | |
| Carbohydrate-protéin-lipide | *Pseudomonas fluorescens* | 27 |
| Protéin PA | *Pseudomonas aeruginosa* | |
| **Biosurfactants particulaire** | | |
| Les vésicules des cellules microbiénnes | *Acinetobactercalcoaceticus* | |
| Cellules entiéres | *Variété de bactéries* | |

## I.5.Production des biosurfactants

Le micro-organisme producteurs de biosurfactants se développent de manière aérobie dans un milieu aqueux contenant une plusieurs sources de carbone comme des hydrates de carbone, des huiles ou des hydrocarbures **[13].**

La structure et les caractéristiques d'un biosurfactant dépendent des condition de croissance, de la source de carbone utilisée et du type de microorganisme.

Les diverses application de biosurfactants nécessitent une méthode facile, rapide et fiable pour découvrir les bactérie productrices de biosurfactants. Les techniques utilisées pour évaluer la production du biosurfactant sont :

a) Activité hémolytique

L'hémolyse sur gélose au sang a été largement utilisée pour le criblage de bactéries productrices des biosurfactants. Cette technique a été découverte par Bernheim et **.[14]** elle a été déjà utilisée pour quantifier la surfactine et les rhamnolipides**[15]**

b) Tension de surface

le phénoméne de tension de surface peut etre expliqué en termes d'énergie, c'est une mesure de l'énergie libre de surfacepar unité de surface nécessaire pour apporter une molécule au sien d'une phase à la surface. Augmenter la surface d'un liquide coute de l'énergie, pour minimiser cette derniere, la plus part des liquides prennent la forme de la plus petite surface

c) Test de déplacement de huile

Cette technique est définie comme un test qualitatif de criblage des souches productrices des biosurfactants. Cette méthode est basée sur la caractéristique du biosurfactant à changes l'angle de contact à l'interface huile-eau .la pression de surface du diosurfactant est capable de déplcer l'huile .les solution contenant plusieurs biosurfactants sont incapables de former des gouttes stables et par la suite unétalement total est observé sur la surface huileuse.

d) Activité émulsifiante

L'émulsification est pratiquement estimée par l'indice d'émulsification E24, la méthode est résumée dans la (Figure I-1**)**

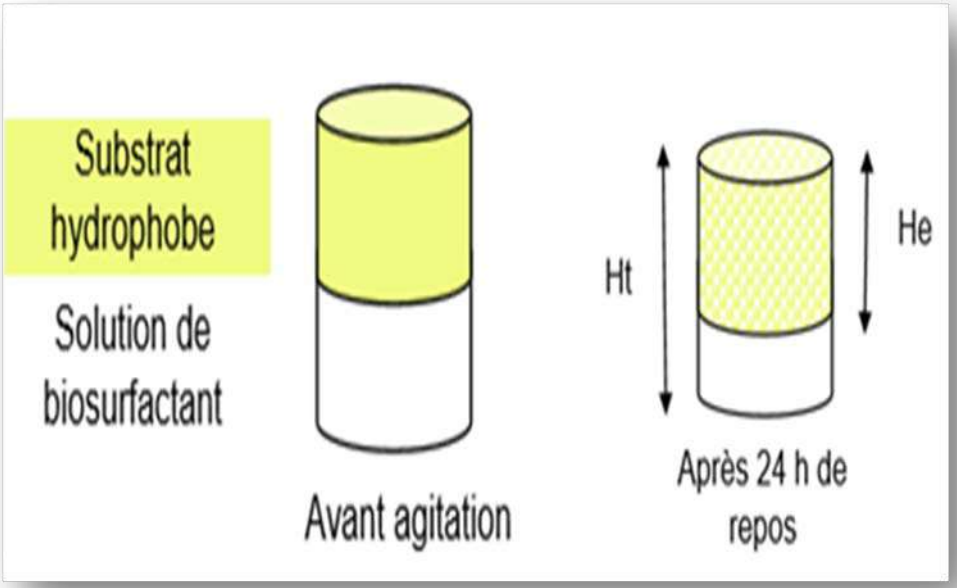



**Figure I-4:** Test de l'indice d'émulsif

### I.5.1.Les substrats carbonés

Il est bien établi que la source de carbone est un paramètre qui a une grande influence sur la production de biosurfactants. Les rendements en biotensioactifs sont plus significatifs avec les substrats insolubles dans l'eau qu'avec ceux qui ne sont pas [2]. De plus, l'utilisation de déchets agroalimentaires ou tout autre polluant à prix relativement bas peut palier au problème du coût de ces agents de surface. Aussi, nous avons choisi de travailler avec les trois substrats suivants : Le gazole, l'huile de tournesol résiduelle de friture et l'huile de tourteaux d'olive.

Nous donnons ci-après les caractéristiques principales de ces sources de carbone.

#### I.5.1.1.Caractéristiques du gazole

Le gazole ou gasoil, plus connu sous le nom de « mazout » est obtenu par distillation fractionnée du pétrole brut entre 180°C et 380 °C à pression atmosphérique. **[16]**

Le gazole est utilisé comme carburant dans les moteurs Diesel et comme combustible.

Le (Tableau I-2**)** reprend les principales caractéristiques physico-chimiques de ce substrat.

| Masse volumique $Kg/m^3$ à 20°C | Viscosité cinématique (en Cp*) à 20°C | Point d'éclair | Température Limite de filtrabilité | Point d'écoulement |
|---|---|---|---|---|
| 850 | 6 | >55°C | - 15°C | 18°C |

**Tableau I-2:** Principales caractéristiques physico-chimiques du gazole [17]

❖ **Composition du gazole**

Le gazole est composé de quatre classes d'hydrocarbures :

- Les n-alcanes ou n-paraffines (hydrocarbures linéaires et saturés)
- Les isoalcanes ou isoparaffines (hydrocarbures ramifiés et saturés)
- Les cycloalcanes ou naphtènes (alcanes cycliques et saturés)
- Les aromatiques (benzène et dérivés).

Généralement, les trois premières classes représentent entre 70% et 75%du total en hydrocarbures, et prés de 25% à 30% d'aromatiques

(Figure I-5**)**.Le pourcentage des alcènes est relativement faible. Les chaînes carbonées de ces hydrocarbures ont de 11 à 25 atomes de carbone **[17].**

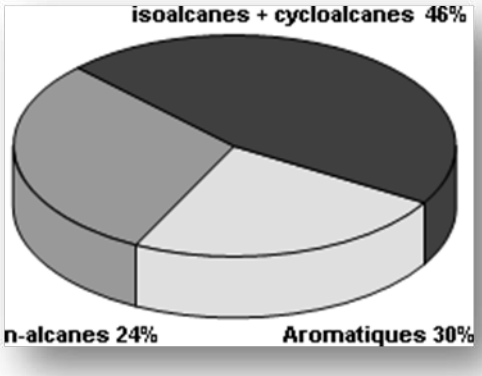



**Figure I-5:** Composition (%) du gazole en différents hydrocarbures D'après Durant, 1998.

### I.5.1.2.Caractéristiques de l'huile de tournesol

Cette huile est extraite de la graine de tournesol.

Le tournesol est une plante annuelle originaire des Amériques, appelée Hélianthus annuus.

Elle appartient à la famille des Asteraceae.

**Tableau I.3** : Principales caractéristiques physico-chimiques l'huile de tournesol

| | |
|---|---|
| Densité | 0,920- 0,925 |
| Indice de refraction | 1,414-1,476 |
| Viscosité (à 20°C) | 51-57Cp* |
| Indice d'iode | 120-134 |
| Indice de saponification | 188-193 |

### I.5.1.3.Composition de l'huile de tournesol

Comme toute huile végétale, l'huile de tournesol se compose de triglycérides, plus connus sous le nom de triacylglycérol (98% à 99%) et une faible proportion de substances diverses regroupées sous l'expression de fraction insaponifiable (Pharmacopée britannique, 2005)

- **Les triglycérides**

Ce sont des esters formés par les acides gras (RCOOH) et d'un trialcool appelé glycérol ($HOCH_2$ –CHOH- $CH_2$ OH). Leur formule générale est :

R-COO-$CH_2$

|

R-COO- CH

|

R-COO- $CH_2$

R: radicale alkyle

Une étude comparative (Tableau I-3) entre une huile de tournesol « fraîche » et une huile de tournesol qui a servi à une friture montre les quelques variations subies par cette huile après chauffage **[18]**

**Tableau I-3:** Composition en acides gras d'une huile de tournesol « fraîche » (HTf) et d'une huile de tournesol résiduelle de friture HTRF [18]

| | **Pourcentage des Acides Gras** | |
|---|---|---|
| **Acides Gras** | HTf | HT RF |
| C 14 :0 | - | 0,1 |
| C 16 :0 | 6,3 | 8,2 |
| C16 :1 | 0,1 | 0,2 |
| C18 :0 | 3,6 | 3,6 |
| C18 :1 | 28,5 | 27,7 |
| C18 :2 | 60,3 | 58,4 |
| C18 :3 | 0,1 | 0,5 |
| C20 :0 | 0,2 | 0,2 |
| C20 :1 | 0,2 | 0,2 |
| C22 :0 | 0,7 | 0,6 |
| C22 :1 | - | - |
| C24 :0 | - | 0,2 |

**I.5.1.4.Caractéristiquesdel'huiled'olive**

L'huile d'olive est la matière grasse extraite des olives lors de leur trituration dans unmoulinàhuile.

Il existe: « des huiles d'olive vierges », extraites du fruit de l'olivier uniquement par desprocédés mécaniques ou d'autres procédés physiques dans des conditions thermiques quin'entraînentpasd'altérationdel'huile,

Des«huilesd'oliveraffinées»,obtenuesparraffinaged'huilesd'olivevierges

Des « huiles de grignons d'olive brutes », obtenues par des méthodes ancestrales ou par traitement au solvant de grignons d'olives.

La production de l'huile d'olive est concentrée autour du bassin méditerranéen. Les 1paysdel'UnionEuropéenneréalisent80%delaproductionmondialequis'élèveà2,72 millions de tonnes par an.

La production annuelle moyenne del'Algérieestde70000 tonnes ,ce qui représente 2,2% de la production mondiale .Elle est classée septième à l'échelle mondiale, le premier rangrevenantàl'Espagnequitotalise45%de la production mondiale.

Lesprincipalescaractéristiquesphysico-chimiquesdel'huiled'olivesontdonnéesau

Tableau suivant(Tableau I-4) :

**Tableau I-4:** Principales caractéristiques physico-chimiques de l'huile d'olive [19]

| | |
|---|---|
| Densité | 0,910-0,916 |
| Viscositéà20°C | 79-84Cp* |
| Indice de refraction | 1,468-1,470 |
| Indice d'iode | 75-94 |
| Indice de saponification | 184-196 |

L'huile d'olive rancit moins vite que l'huile de tournesol car son indice d'iode est plusfaible.

- **Composition de l'huile d'olive**

L'huile d'olive est composée de prés de 99% en matières grasses, principalement des triglycérides .Le reste constitue la fraction des insaponifiables qui est l'un des traits caractéristiques de l'huile d'olive ; en effet, son contenu en squalène est plus élevé que celuides autres huiles végétales, ses stérols sont composés de bêta-sitostérol pratiquement pur(NormeCODEX-33).Des phénols et des dérivés du tocophérolap partiennent à cette fraction.Les triglycérides sont constitués d'acides gras de différentes sortes dont la répartition est caractéristique de cette huile(Tableau I-5).

**Tableau I-5 :** Composition moyenne en acides gras dl'huile d'olive[19]

| **AcidesGras** | **Pourcentage des Acides Gras** |
|---|---|
| C16:0 | 7,0-22 |
| C16:1 | 0,3-4,3 |
| C18:0 | 0,7-5,0 |
| C18:1 | 48-85 |
| C18:2 | 3,1 |
| C18:3 | 0,1-1,6 |
| C20:0 | 0,1-1,7 |
| C20:1 | <0,1 |
| C22:0 | <0,2 |
| C24:0 | <1,0 |

### I.5.2.Microorganismes producteurs

Les biosurfactants sont principalement produits par des micro-organismes se développant de manière aérobie dans un milieu aqueux contenant une ou plusieurs sources de carbone, comme les hydrates de carbone, les huiles ou les hydrocarbures. Ces microorganismes sont en général des levures, des champignons ou des bactéries .

Le principal rôle physiologique du biosurfactant est de permettre aux microorganismes de se développer sur des substrats insolubles en réduisant la tension interfaciale entre l'eau et le substrat, rendant ce dernier plus facilement accessible **[20].**

Les bactéries utilisées pour produire les biosurfactants sont en général issues de sols contaminés par des molécules hydrophobes comme les HAP . Elles sont donc isolées de leur milieu naturel et sont cultivées en laboratoire. Ceci permet de faire des tests pour

choisir la meilleure source de carbone et d'optimiser les milieux de culture afin d'obtenir de production de biomasse .

Dans tous les cas, le biosurfactant obtenu est un mélange de plusieurs molécules. Par exemple, dans le cas du biosurfactant produit par une souche de ***Pseudomonas aeruginosa*** UG2, on obtient un mélange de quatre rhamnolipides .

Les bactéries produisent des molécules de faible masse molaire, qui diminuent efficacement les tensions interfaciale, ainsi que des polymères de masse molaire élevée, qui se lient fortement aux surfaces [**12**]. Les biosurfactants de faible masse molaire sont généralement des glycolipides, alors que ceux de masse molaire élevée sont constitués des polysaccharides, des protéines, de lipopolysaccharides ou des lipoproteines. Ces derniers sont moins efficaces pour réduire les tensions interfaciales, mais plus efficaces pour entourer les gouttes d'huiles et empêcher leur coalescence.

### I.5.3.Etude de la croissance bactérienne

La croissance bactérienne peut être définie comme une augmentation des constituants cellulaires. Elle aboutit à un accroissement du nombre de cellules quand le micro-organisme se multiplie par scissiparité ou par bourgeonnement. Dans ce cas, les cellules s'élargissent et se divisent pour donner deux cellules filles de taille plus ou moins égale. Il n'est pas facile d'analyser la croissance et la division de micro-organismes pris individuellement à cause de leur petite taille. Les microbiologistes suivent normalement des variations statistiques sur la totalité de la population quand ils étudient la croissance.

#### I.5.3.1.Technique d'évaluation de la population microbienne

L'étude de la croissance microbienne ne peut être faîte valablement que si on dispose de techniques appropriées d'évaluation de la population microbienne dont on veut étudier l'évolution

La méthode que nous avons retenue est la turbidimétrie : elle se base sur un système de détection optique qui mesure la turbidité, c'est-à-dire la concentration de très petites particules en suspension dans une solution. La lumière transmise à travers un milieu turbide dépend de la concentration en objets diffusants et de leurs sections efficaces d'extinction ; donc de leurs tailles, leurs formes, leurs indices de réfraction et de la longueur d'onde considérée.

Pour de faibles concentrations, l'intensité transmise peut être déterminée par la loi de *Beer-Lambert* :

$$\mathbf{A}_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda}.\ \mathbf{l}.\ \mathbf{c}\ \text{où}$$

Avec :

**l :** longueur du chemin optique (en pratique, l correspond à l'épaisseur de la cuve de mesure qui généralement est de 1cm.

**$\varepsilon_{\lambda}$ :**: coefficientd'extinctionmolairedel'espèceabsorbanteensolution

**c:** concentration molaire de l'espèce absorbante.

Ainsi, la mesure de la Densité Optique (D.O.) ou Absorbance à une longueur d'onde $\lambda$ donnée **($A_{\lambda}$) ,** permet de remonter à la concentration des particules absorbantes.

Dans notre cas, la mesure de cette absorbance est effectuée à $\lambda$ = 600 nm, valeur retenue dans plusieurs publications pour les genres bactériens que nous utilisons. Une courbe d'étalonnage du spectrophotomètre est nécessaire pour déduire la concentration en biomasse. Pour les suspensions denses, on effectue la mesure après dilution pour rester dans les limites de proportionnalité énoncées par la loi de *Beer-Lambert*, la proportionnalité entre la densité optique et le nombre de molécules absorbantes n'étant valable que pour les solutions suffisamment diluées.

## I.6.Paramètres influençant la production

Le type et la quantité de biosurfactants produits varient avec la composition du milieu (source de carbone ou autres nutriments) et les conditions de culture (température, agitation, pH, etc.)

### I.6.1.Influence de la source de carbone

La source de carbone est l'un des paramètres influençant le plus la production des

Biosurfactants, soit par induction, soit par diminution de la quantité produite. Les sources de Carbone solubles dans l'eau (glycérol, glucose, mannitol ou éthanol) sont utilisées pour Produire des rhamnolipides. Cependant, les rendements semblent être inférieurs à ceux Obtenus sur des substrats insolubles.

### I.6.2. Influence de l'azote

De nombreuses études ont montré que la synthèse de rhamnolipides se produisait lorsqu'il y avait un excès de carbone dans le milieu ou lorsque l'azote était en quantité militante.

L'azote peut être apporté sous différentes formes selon les bactéries productrices, cependant pour avoir des rendements de production optimum, il est donc nécessaire d'avoir un rapport C/N idéal, et surtout que l'azote soit un facteur limitant (stress) pour favoriser la production de biosurfactant**[21].**

### I.6.3.Influence du pH

Le pH qui est un facteur très important et qui est plus ou moins relatif à la production, c'est à dire une valeur supérieur ou inférieur à celle optimal influence la production.

### I.6.4.Influence des sels minéraux

Il semblerait qu'une concentration limitant en ions magnésium, calcium, potassium sodium ou éléments traces induise une augmentation de production **[22].**

### I.6.5.Influence de l'oxygène

La disponibilité de l'oxygène peut également affecter la production à travers son effet sur l'activité cellulaire ou la croissance **[21].**

### I.6.6.Influence de la vitesse d'agitation

Les milieux de culture sont agités lors de la production de biosurfactant. Pour les bactéries, une augmentation de la vitesse d'agitation induit une augmentation des vitesses de cisaillement et donc un rendement moindre. L'effet inverse est observé lorsque les organismes producteurs sont des levures **[2]**

## I.7.Propriétés physico-chimique des biosurfactants

D'après Larpent (1995), les biosurfactants sont des molécules amphiphiles ayant deux parties fonctionnelles

- Une partie lipophile, non polarisée (soluble dans les solutions apolaires).
- Une partie hydrophile, polarisée (soluble dans les solutions aqueuses).

Cette structure confère aux molécules de biosurfactants un certain nombre de propriétés physico-chimiques particulières [23].

### I.7.1.Caractéristiques physiques des biosurfactants

Diminution des tensions de surface

Les biosurfactants diminuent considérablement la tension superficielle de l'eau même dans les solutions très diluées. Ceci apparait dans l'exemple suivant : la tension superficielle de l'eau pure est de 72,80 mN / m **[24].**

### I.7.2.Concentration micellaire critique (CMC)

La concentration critique micellaire (CCM) est par définition la concentration d'un agent de surface (biosurfactant) au dessus de laquelle, une partie des molécules dispersées au sein de la solution aqueuse se rassemblent sous forme de micelle [**25].**

Les micelles se forment lorsque les portions hydrophobes incapables de former des liaisons hydrogène en phase aqueuse créent une forte augmentation de l'énergie libre du système. Une façon d'abaisser cette énergie est d'isoler la partie hydrophobe de l'eau par adsorption sur des matrices organiques ou de former des micelles **[26**].

En effet, dans les micelles les parties hydrophobes se regroupent vers le centre et les portions hydrophiles restent en contact avec l'eau(Figure I-6)

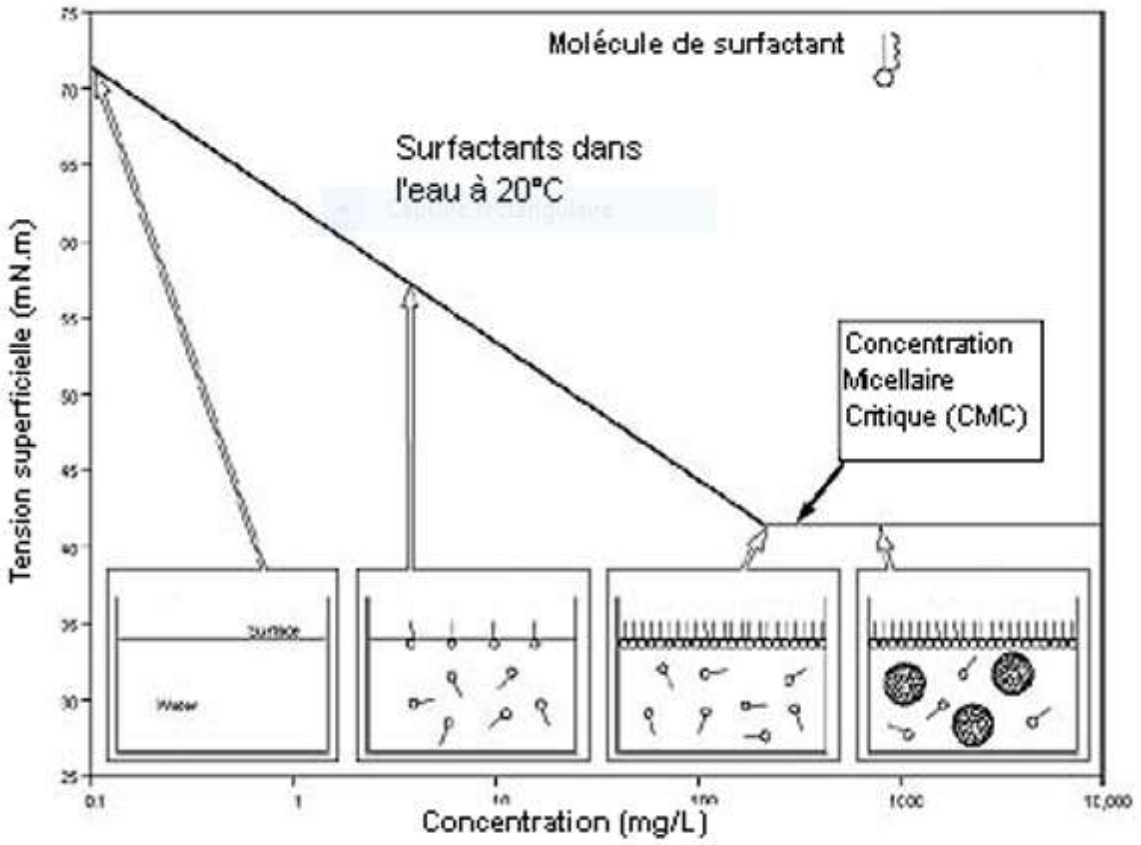



**Figure I-6 :** Variation de certaines proprietés physiques en fonction de la concentration du tensio- actife autour de la CMC [27].

### I.7.3.Caractéristiques techniques excellentes

- Diminution de la tension interfaciale (≈0,1 dy/cm) .

- Diminution de la tension de surface (≈27 dy/cm) .

- Emulsifiants (50- 100%) .

- Pouvoir moussant (mousse stable) .

- CMC (concentration micellaire critique) (20- 200 mg/l) .

- Pouvoir antibiotique ou fongicide.

### I.7.4.Stabilité thermique et chimique

Plus stables que les tensio-actifs chimiques : pH (2-10), salinité (5- 20%) et

### I.7.5.Caractéristiques écologiques

- Biodégradables et non toxiques

- Temps de stockage long

- Production à partir des déchets industriels (effluents des huileries, graisse animale, lactosérum, déchets riches en amidon,) en diminuant leur effet polluant et conduisant à une réduction du coût de production.

## I.8.Extraction des biosurfactants du milieu de croissance

Pour extraire le biosurfactant extracellulaire du milieu de croissance, il est d'abord nécessaire de séparer les bactéries de ce milieu de culture (par centrifugation par exemple).

Il est bien connu que la majorité des produits de fermentation sont libérés dans la phase aqueuse diluée. Par conséquent et dans plusieurs cas, le processus précité comprend environ 60% du rendement total du produit. Du à des considérations économiques, la majorité des applications de biosurfactants fait appel soit à la culture microbienne en bouillon ou bien la préparation brute. De plus, l'interférence due à la présence d'autres substances dans l'activité des préparations de biosurfactant brut est négligée **[28].**

Le choix de la méthode de récupération d'un biosurfactant particulier, dépends de sa charge ionique, de sa solubilité dans l'eau ainsi que du fait qu'il soit lié à la cellule ou extracellulaire. Les méthodes utilisées sont listées dans le tableau au-dessous. Ça comprend l'extraction aux solvants organiques, l'adsorption suivie d'extraction aux solvants, la

précipitation, la cristallisation, la centrifugation, le fractionnement de mousse. Le majorité des biosurfactants sont secrétés dans le milieu, et isolés après filtration ou bien suite à une centrifugation qui élimine les cellules [**28].**

**Tableau I-6:** les méthodes communes employées dans la récupération de biosurfactants[29].

| Méthodes |
|---|
| **a.** Extraction à partir d'une fermentation en batch |
| - Extraction aux solvants |
| - Cristallisation |
| - Précipitation au sulfate d'ammonium |
| - Précipitation acide |
| - Précipitation éthanol |
| -acide acétique |
| - Précipitation acétone |
| **b.** Extraction à partir d'une fermentation continue |
| - Centifugation |
| - Séparation de mousse et précipitation |
| - Diafiltration et précipitation |
| - Adsorption |
| - Filtration tangentielle |

## I.9.Rôle des biosurfactants pour la bactérie

Le principal rôle physiologique du tensioactif est de permettre aux micro-organismes de se développer sur des substrats insolubles en réduisant la tension interfaciale entre l'eau et le substrat, rendant ce dernier plus facilement accessible **[30] [31].** Cependant, les biosurfactants peuvent avoir d'autres rôles aussi importants que l'émulsification, par exemple : l'adhésion aux surfaces solides et la formation de biofilms la régulation du niveau énergétique cellulaire l'activité bactéricide, la pathogénicité de certaines bactéries, ainsi que le piégeage des métaux lourds **[11**].

## I.10.Utilisation des biosurfactants

Les biosurfactants sont reconnus pour être non toxiques, biodégradables et peuvent être utilisés dans des conditions extrêmes **[2]**. C'est pourquoi ils peuvent êtreutilisés dans de nombreux domaines. Cependant, il semblerait que les biosurfactants soient

Principalement utilisés par l'industrie pétrochimique **[24].**

**Tableau I-7:** Utilisations potentielles des biosurfactants[2]

| Fonction | Champs d'application |
|---|---|
| Emulsifiant et dispersant | Cosmétiques, peintures |
| Solubilisant et micro-émulsions | Pharmaceutique, articles de toilette |
| Agent mouillant et pénétrant | Pharmaceutique, industrie textile, peinture |
| Détergent | Nettoyants ménagers, produits de l'agriculture ou de haute technologie |
| Agent moussant | Cosmétiques, articles de toilette, flottation de minerais |
| Dispersant | Séparation des mélanges goudron/pétrole ou goudron/eau |
| Aide à la croissance bactérienne | Fermentation |

## I.11. Modes d'action

Les biosurfactants agissent de façons différentes : par mobilisation et par solubilisation.

### I.11.1. Mobilisation

Par définition, la mobilisation dépend de la capacité des biosurfactants à diminuer les tensions interraciales entre les NAPL (Non Aqueous Phase Liquids) et l'eau lorsque les molécules de tensioactifs se partagent à la surface du NAPL[**32**].

La mobilisation se subdivise en deux étapes : une étape de déplacement et une étape de dispersion.

Le déplacement correspond à la libération des gouttes de NAPL du milieu poreux grâce à la réduction des tensions interfaciales. La dispersion est le processus au cours duquel les NAPL se dispersent dans la phase aqueuse sous forme de fines émulsions **[33].**

### I.11.2. Solubilisation

La solubilisation est le mode d'action privilégié pour traiter les sols ; elle résulte de la formation de micelles. La solubilisation est basée sur la capacité des solutions micellaires à augmenter la solubilité des contaminants hydrophobes **[34].**

Généralement, en deçà de la CMC, les monomères en solution n'ont pas ou peu d'effet

## I.12.Conclusion

Les surfactants sont des agents à activeté de surface synthétisés chimiquement ou par voie biologique (biosurfactant) .ces molécules sont principalement produites par des mico-organismes qui ce développent de manière aérobie dans un milieu contaminé contenant une ou plusieurs soures de carbone.

Les biosurfactants constituan une classe de molécules biologique ayant divers Intéréts dans plusieurs domaine, allant de l'industrie agroalimentaire, chimique, cosmétique, pharmacetique…..etc, à l'application dans domaines plus critiques ; biomédicale et thérapeutique.

Dans notre travaile on s'intéresse à la caractérisation et production de biosurfactant par des souches microbiennes.

# Chapitre II

# Matériels et Méthodes

# chapitre II : Matériels et Méthodes

## II.1. Matériels Utilisés dans les expériences

**Tableau II-1**:Matérieles utilisés

| Instruments | Modèle | Pays |
|---|---|---|
| Etuve | D-91126Schwa Bach FRG | Memment Gmbh +Co KG Allemagne |
| Spectrophométre UV-VISIBLE Mini 1240 | Shimadzu | JAPON |
| Spectrophotométre Infrarouge Transformé de Fourrier(FTIR) | Shimadzu | JAPON |
| pH mètre | Inolal Ph level 1 | WTW ,GERMANY |
| Secoueur Vortex | VTX400 | Labo Moderne France |
| Agitateur | IKA-Mini MR | IKA-Werk Straufen Allemagne |
| Centrifugeuse | D-78532 Tuttlingen | Hettich Zentrifugen Allemagne |
| Balance électronique | Itten NOARRV 70 | OHAUS –CHANE |
| Incubateure | INCUBLCAP SHAKER 230VEU | USA |
| Autoclave | OT012 | TURKEY |

## II.2. Réactifs utilisés

**Tableau II-2:**Réactifs chimiques utilisés

| Réactifs | Forme chimique | Purté | Origine |
|---|---|---|---|
| Peptone | Mélange | 98% | Riedel-de Haen |
| L'extrait de levure | Mélange | 98% | Riedel-de Haen |
| Chlorure de Sodium | NaCl | 99.9% | Riedel-de Haen |
| Chlorure de Calcium | $CaCl_2$ | 98% | Riedel-de Haen |
| Chlorur de Magnesuim | $MgCl_2$ | 98% | Riedel-de Haen |
| Chlorure d'Ammoniac | $NH_4Cl$ | 98% | Riedel-de Haen |
| Hydrogéno Phosphate de Potassium | $K_2HPO_4$ | 98% | Riedel-de Haen |
| Phosphate de potassium mono basique | $kH_2PO_4$ | 98% | Riedel-de Haen |
| Chlorur de Fer | $FeCl_2$ | 98% | Riedel-de Haen |
| Chlorur de Zinc | $ZnCl_2$ | 98% | Riedel-de Haen |
| Chlorure de Manganèse | $MnCl_2$ | 98% | Riedel-de Haen |
| Acide Borique | $H_3BO_3$ | 98% | Riedel-de Haen |
| Molybdate de sodium | $NaMoO_4$ | 98% | Riedel-de Haen |
| Acide chlorhydrique | HCl | 35.5% | Riedel-de Haen |
| Acétone | $C_2H_6O$ | 99% | Fluka |
| Hydroxyde de Sodium | Na OH | 99% | Riedel-de Haen |

### II.3 Verrerie et matériels plastiques

- Erlenmeyers de 50ml, 100ml, 250ml, 500ml, 1000ml, 2000 ml
- Bechers de 10ml, 20 ml, 50ml, 100ml, 250ml ,500 ml , 1000 ml

- Boites de Pétri en plastique
- Pipettes graduées - Pipettes pasteur
- Tubes à essai
- Micropipette
- Cuvettes de spectrophotomètre
- Barreaux magnétique
- Fioles des 500 ml
- -Entonnoir
- Cristallisoir

## II.3.Micro-organismes utilisés

Notre travail est focalisé sur la production des biosurfactants en utilisant deux bactéries differente : *la marinobacter hydroarbonoclasticus* . Et la *klepsiella pneumonia* Ces bactéries isolées et purifiées, sont testées pour leur capacité à synthétiser des biosurfactants à travers une multitude de testes qualitatifs.

### II.3.1.Caractérisation de la souche marinobacter hydrocarbonoclasticus

La souche *marinobacterhydrocarbonoclasticus* est isolée à partir d'un consortium microbien enrichi par le pétrole, en présence d'une eau de mer de salinité de 3,5% (m/m). Elle se présente sous la forme de coccobacilles. Sur boites de Pétri, les colonies ont la forme ronde régulière, d'une taille de 5 mm, plates, lisses, d'une consistance gluante, translucides et d'une coloration marron claire à sécrétion abondante (. La souche SdK644 est Gram (-), immobile, catalase (+) et oxydase (+) **[35]**.



**Figure II-1:** Forme des colonies de la souche SdK644 cultivée dans le milieu LB, après 48h d'incubation.[35]

### II.3.2.Caractérisation de la souche Kp

klebsiella pneumoniae : Le genre klebsiella,de la famille des entérobactéries ,comporte cinq espèces dont l'espèces –type est klebsiella pneumoniae qui est la plus fréquente des bactéries a gram-négatif .cette bactérie est fréquemment isolée de l'environnement (eaux usées ,sol,…etc).la culture sur une gélose nutritive donne des colonies d'aspect muqueux comme le montre la figure suivantes




**Figure II-2 :** Aspect de la Klebsiella pneumoniae.

## II.4.Production du biosurfactants

### II.4.1.1.Préparation du milieu de culture

Le principe est de fournir aux bactéries tous les éléments nécessaires pour qu'elles puissent se développer en présence d'une substance huileuse comme seule source de carbone et donner un grand rendement en biosurfactants. Pour obtenir une culture masseuse on a utilisé le milieu de culture le milieu LB dont la composition est :

| Composants | Quantité (g/L) |
|---|---|
| Na Cl | 23 |
| Extrait de levure | 5 |
| Peptone | 10 |

**Figure II-3** :Les Composants du milieu LB

La préparation de l'inoculum consiste à la réalisation d'une culture des souches. Il est préparé en prélevant une colonie à partir d'une culture jeune et en l'ensemençant dans un flacon de 250ml contenant 100mL du milieu LB .l'incubation s'effectue à 37 dans un Incubateur agitateur, à pH=7

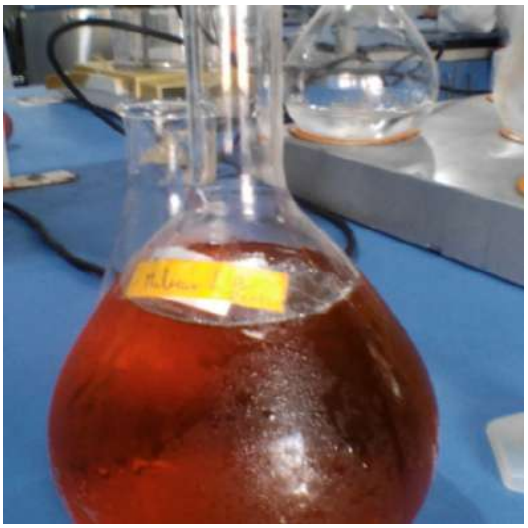


**Figure II-4:** milieu L.B préparation de l'inoculum

### II.4.2. Préparation du milieu de production (MM)

La composition du milieu MM est comme suit :

**Tableau II-3** : composition du milieu MM.

| Composants | Qantité g/l |
|---|---|
| $CaCl_2$ | 0.05 |
| $NaCl_2$ | 23 |
| $MgCl_2$ | 0.33 |
| $NH_4cl$ | 0.4 |
| $KH_4Po_4$ | 0.3 |
| $kH_2Po_4$ | 0.3 |

Avec 1ml de la solution oligo-éléments dont la composition est comme suit :

**Tableau II-4:** Solution oligo-eléments

| Composants | Qantitié mg/l |
|---|---|
| $FeCl_2.4H_2O$. | 150 |
| $ZnCl_2$ | 70 |
| $MnCl_2.6H_2O$ | 100 |
| $H_3Bo_3$ | 6 |
| $CoCl_2.6H_2O$ | 190 |
| $NaMoO_4.2H_2O$ | 36 |
| Hcl | 6.7ml |

Tous les composants sont mélangé dans un bécher à pH =7

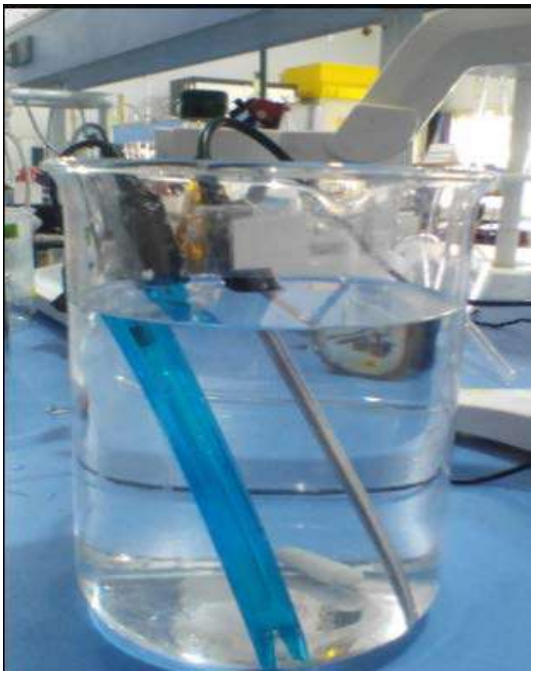


**Figure II-5**:Ajustement du pH

## II.5. Mode opératoire

Dans un environnement stérile, et à partir d'une culture sur gélose nutritive on prélève une surface d'environ 10 cm2 d au moyen d'un fil à boucle stérilisé et on l'introduit dans un erlenmeyer de 250 ml contenant 100 ml de bouillon nutritif (Lb) préalablement autoclave. L'incubation s'effectue à 30°C dans un incubateur à agitation du type (IKA KS 40001) à 150 tr/min pendant 24h.

La production de biosurfactant s'effectue dans des flacons de 200 ml contenant 100 ml de milieu MM préalablement autoclave additionné de 1 % d'huile d'olive comme seule source de carbone. Ce milieu est inoculé par 1 % de la pré-culture précédente et l'incubation s'effectue à 30°C dans un incubateur à agitation à 150 tr/min pendant 3 jours.

- L'huile d'olive est utilisé comme une source de carbone, pour être additionné au milieu à **1%** elle est filtrée à travers des filtres stérilisants.

Des prélèvements sont effectués toutes les 24heures, avec le suivi régulier de La concentration microbienne.

Il faut signales que pour la souche klebsiella on a utilisé une source de carbone différente : un pesticide largement utilisé dans la région de Médéa c'est un insecticide produit sous le nom commercial : Assail et CHIPCo par Aventis CropSciences. Il est systémique et destiné à contrôler sucer lesinsectes (lépidoptères, thysanoptères, hémiptères, pucerons principalement sur lescultures comme les légumes à feuilles, agrumes fruits, pépins de fruits, raisins,, leschoux et les plantes ornementales .Acétamipride est un insecticide appartenant aux néonicotinoïdes de chloropyridinyle, cette famille d'insecticides a été introduite au début des années 1990 [36].

Son nom chimique est N - [(6-chloro-3-pyridyl) méthyl] - N ' -cyano- N -méthyl-acétamidine.

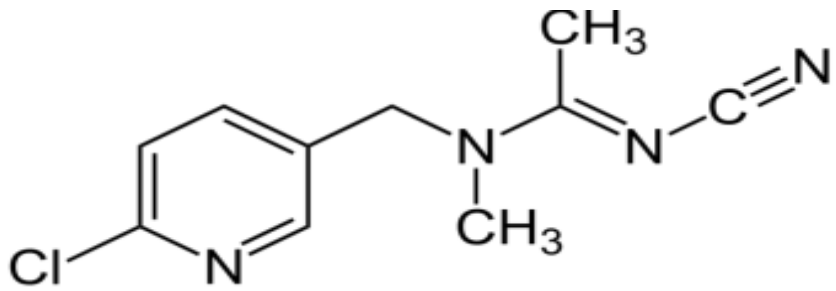



**Figure II-6 :** Structure chimique de l'acétamipride.

**Tableau II-5** : Caracteristiques chimiques du pesticide utilisé

| **Pesticides** | **Acétamipride** |
|---|---|
| La famille chimique | Néonicotinodes |
| La formule chimique | $C_{14}H_{11}ClN_4$ |
| La masse molaire (g /mol) | 222.674 |
| Solubilité dans l'eau a 20C° | 4.25 g/l |
| Longueur d'onde ƛ (nm) | 244 |

Le but de cette étude est d'évaluer la capacité de la *klebsiella* à produire un biosurfactant en utilisant le pesticide comme source de carbone.

**[37**]Direction de la protection des végétaux et des contrôles techniques (2017) Index des produits phytosanitaires. Algérie.

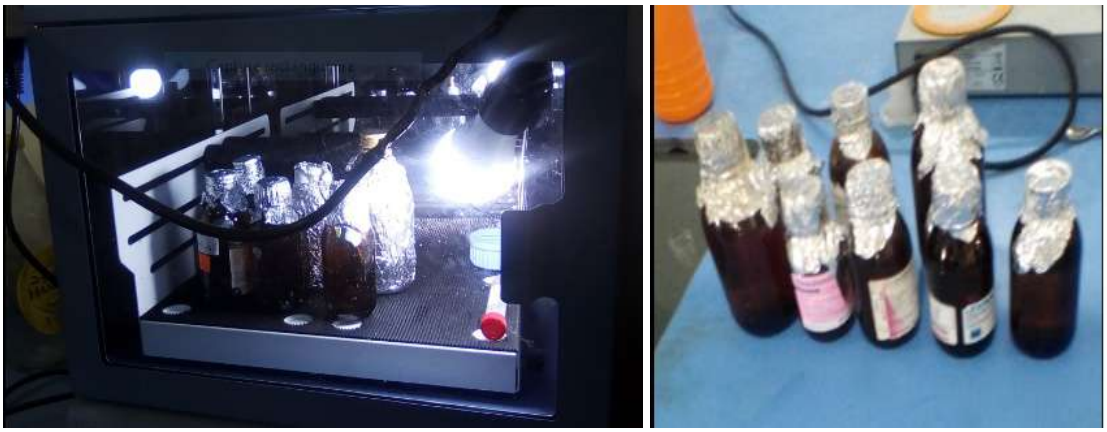


**Figure II-7:** répartition du milieu MM dans les flacons.

## II.6.Suivi de la Production du biosurfactant

Des prélèvements sont effectués chaque 24 h pour suivre les paramètres suivants :

### II.6.1. Mesure de la DO

croissance bactérienne

Un volume de culture est prélevé régulièrement chaque jours dans des tubes ,le surnageant a été analysé par balayage dans la région à 600nm . un spectrophotomètre UV-Visible, ceci permettra de déterminer la croissance de bactérie.

### II.6.2. Test de déplacement d'huile

Dans une boite de pétri contenant l'eau distillée, un volume d'huile d'olive est étalé sur toute la surface de l'eau distillée .Ensuite ajoutant du surnageant de culture est légèrement placé au centre de la couche d'huile d'olive .Le diamètre (en cm) de la surface de l' halo claire est mesuré après quelque temps .Plus le diamètre est grand plus la production de biosurfactant est important.

### II.6.3.Indice d'émulsification

Un volume de 2ml de surnageant de culture est mélangé avec 2ml d' huile d'olive .

Le mélange est ensuite agité au vortex pendant 2min à vitesse maximale, puis laisser au repos pendant 24h avant de prendre la mesure.

L'activité émulsifiante ou l'indice d'émulsification(E24) est défini comme étant le rapport entre la hauteur de l'émulsion(He) formée et la hauteur totale(Ht) du mélange



**Figure II-8:** Testde l'indice d'émulsification

Il s'exprime en pourcentage par la formule suivant : $E_{24}$ =He/Ht*100

-Hauteur d'émulsifiant

-Hauteur de surnageant

### II.6.4.Extraction et purification partielle du biosurfactant

Après trois jours de culture et lorsque l'activité de biosurfactant est maximale dans le milieu (cela est vérifié par un examen rapide avec le test déplacement d'huile) .le volume entier de la culture est éliminé de la biomasse par centrifugation à une vitesse de 3900 tr/min pendant 30 minsuivi par une filtration surpapier filtre ordinaire .Le surnageant correspond au biosurfactant brut est précipité par l'acétone ,cette opération a été effectuée par le dosage de trois volumes d'acétone goutte à goutte sur un volume de surnageant déposé sous agitation avec l'utilisation de la glace à 4C°,le mélange homogène (surnageant –acétone ) est mis dans

le réfrigérateur pendant 24h ,puis il est centrifugé à 200tr/min. le solide récupéré a été séché dans l'étuve à 37°C après 48h , la poudre obtenue par la suit c'est le biosurfactant .

-A la fin peser la quantité de biosurfactant .

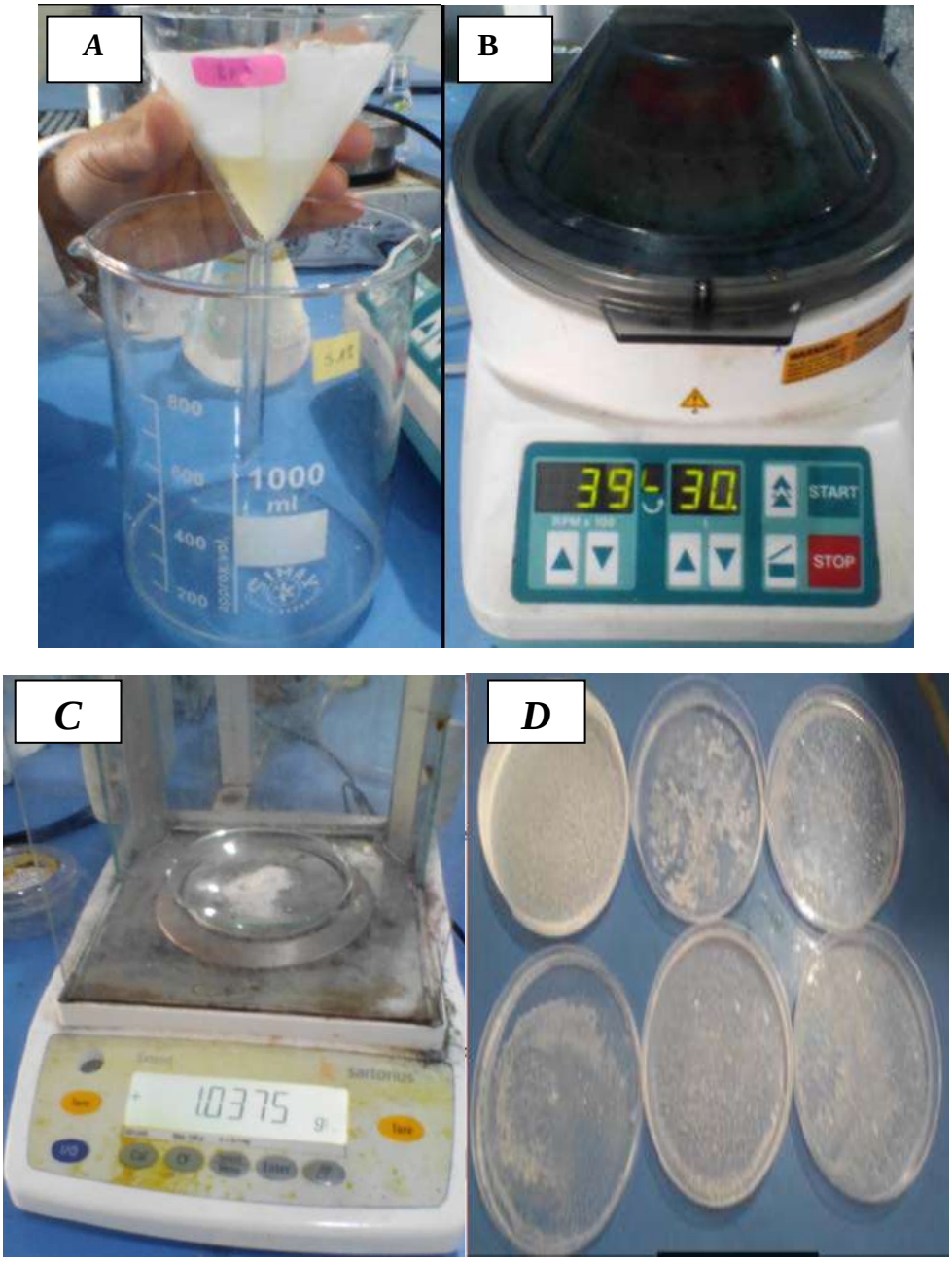



**Figure II-9:** Extraction du biosurfactants.

## II.7.Caractérisation du biosurfactant

❖ **Spectrophotométrie infrarouge IR**

• **Principe**

Les techniques de spectrophotométrie infrarouge sont utilisées pour la détermination du groupement fonctionnel permettant de proposer la structure, chaque liaison présente des vibrations caractéristiques de fréquence bien déterminée [59]. Les groupements moléculaires possèdent un certain nombre de modes de vibration caractéristiques qui sont déterminés par les masses des atomes constituant les forces interatomiques et la géométrie des arrangements, c'est-à-dire la structure. Les vibrations modifient le moment électrique dipolaire, ce qui entraine l'absorption des ondes électromagnétiques dans la région 1 à 100 µm qui Correspondent au domaine de la spectrographie infrarouge [60].



**Figure II-10:** Les équipements d'infrarouge IR

# *Chapitre III : Résultats et discussion*

# chapitre III : Résultats et Discussion

## III.1.la production de biosurfactant

L'influence de la nature de la source de carbone sur la production de biosurfactants en utilisant deux défférant de souche, huile d'olive.

Les paramètres mésurés sont :

## III.2. Mesure de la DO

D'après les résultats obtenus

**Tableau III-1:** mesure de DO

| Souches / DO | Sdk | kp |
|---|---|---|
| **1ère jour** | 0.102 | 1.091 |
| **2ème jours** | 0.325 | 1.402 |
| **3ème jours** | 0.412 | 1.601 |

### III.2.1.Test de de placementde huile (DDH)

Les résultats obtenus montrent que le biosurfactant, testé est réalisé dans le deux défférent souches respectivement. productrices de biosurfactant

Les résultats expérimentaux montrent clairement que la plus grande réduction de la tension de surface est obtenue après un jour d"incubation, à cette valeur de TS, le diamètre de la surface halo clair.

**DDH** de première expérience est **: 7** cm

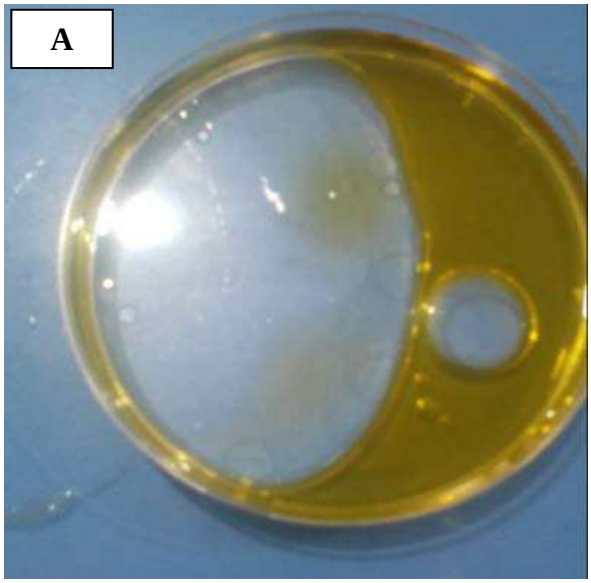



**Figure III-1:** Test de deplacementde huile d'olive

**Le DDH** de deuxième expérience c'est : **9**cm

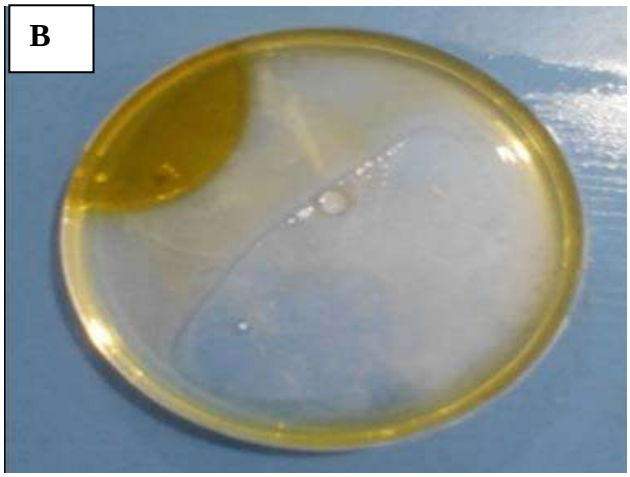



**Figure III-2:** Test de DDH

### III.2.2.Détermination de l'indice d'emulsion $E_{24}$

Afin d'estimer la production des biosurfactants par la souche isolée (sdk644 , k p), nous avons réalisé le test d'émulsification ($E_{24}$) qui consiste à homogénéiser 2 ml de milieu de culture avec 2 ml de huile d'olive .

Les résultats obtenus sont :

**Expérience (1) :**

-Hauteur d'émulsifiant = 1.5 cm

-Hauteur de surnageant = 2.5 cm

$E_{24}$ = **(1.5/2.5)*100**

= **65%**

**Expérience (2) :**

-Hauteur d'émulsifiant = 1.7cm

-Hauteur de surnageant = 2.3cm

$E_{24}$ **= (1.7/2.3 )*100**

**= 73%**

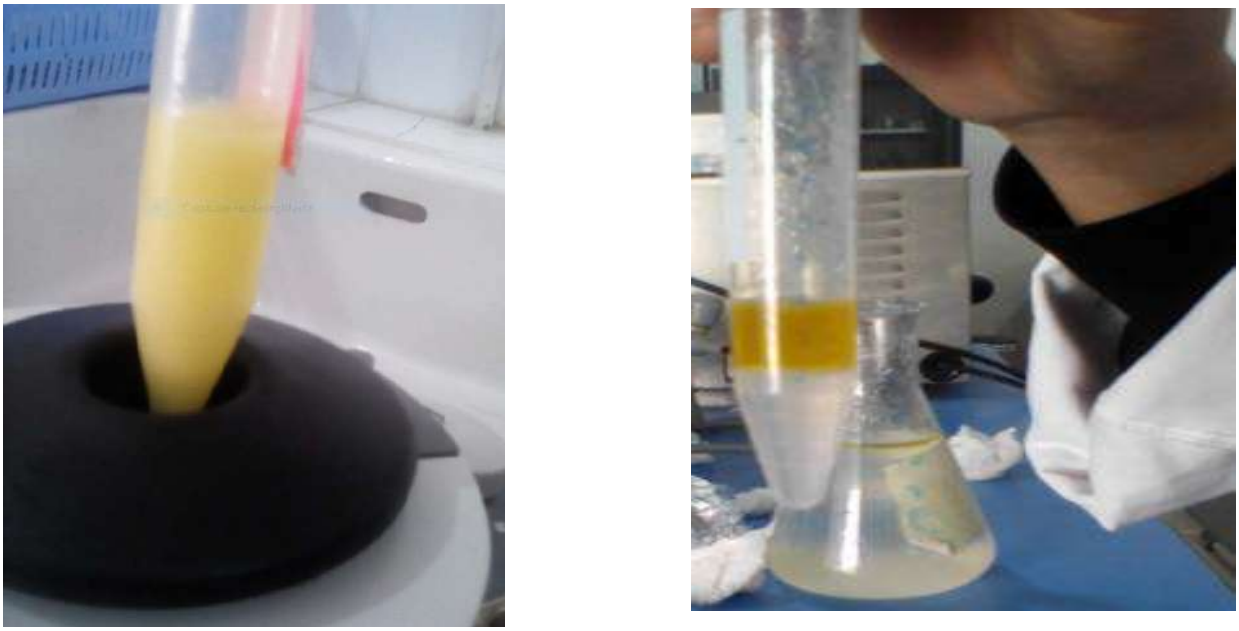


**Figure III-3:** Test s'emilsification

## III.4. Discussion

Le choix de la source de carbone additionnée dans le milieu culture n'est pas aléatoire , il se base sur plusieurs lectures faites de recherches effectuées par d'autres chercheurs.

Des rendements importants en biosurfactants et forte stabilité des émulsions étaient

obtenus dans les travaux de Sifour et ses collaborateurs (2007) sur ***Pseudomonas aeruginosa*** lorsque la source de carbone utilisée était l'huile végétale et pas l'hydrocarbure.

Varadharajan et subramaniyan (en 2013) ont comparé l'utilisation de plusieurs déchets agroalimentaires et huiles comme source de carbone pour la production. L'huile végétale est considérée selon eux, parmi les sources qui donnent les meilleurs rendements en biosurfactants.

En regardant le résultats obtenus montrants que la défférence entre la mailleure souches de production de biosurfactants à partire de testde densité optique : ***marinobecterhydrocarbonoclasticus sdk 644 et klepssiella pneumonia*** chaque jours . le (k.p) c'est la souche qui donné la bonne criossance bactirienne qui sont utilisent le huile d'olive comme source de carbone.

Cela avait un effet sur la production révélée par test de déplacement d'huile.

La meilleure productivité est observée chez les souches ***(k.p)*** (**ddh=**9cm) un grand halo claire contre la souche ***sdk 644*** (**ddh**= 7cm). Ces deux bactiries correspondants utilisants le même source de carbone.

En suite les résultats des test $E_{24}$ de la culture de deux souches en présence huile d'olive comme substrat a permis la production d'une quantité importante de biosurfactants ayant un bonne indix d'emilsification . la biosurfactant ***(k.p***) posséde un bonne pouvoir émulsion : $E_{24}$=73% et le ***marinobacterhydrocarbonoclasticus sdk644 ($E_{24} = 65\%$)***.

A partire de la résultats obtenus sur la quantité de production de biosurfactant entre trios souches défférants .la souche le plus productrice du biosurfactant est *Marinobacterhydrocarbonoclasticus sdk644* .le tableau suivant résume la défférance :

Les résultats de la souche pseudomonas aeeugenosa ont été tirés de mémiore [dégradation des pesticides en milieu aqueux par un bioprocédé ](2020).

**Tableau III.2** : quantité du biosurfactant en poudre.

| Les souches | Quantité en gramme(g) |
|---|---|
| *-pseudomonas aerugenosa* | 0.5g pour 200 ml de surnagent |
| - *LaMarinobecterhydrocarbonoclasticus sdk644* | 1.037g pour 300 ml de surnagent |
| *-Klepssiella pneumonia* | 0.422g pour 100 ml de surnagent |

## III.4.1. Caractérisation du biosurfactant :

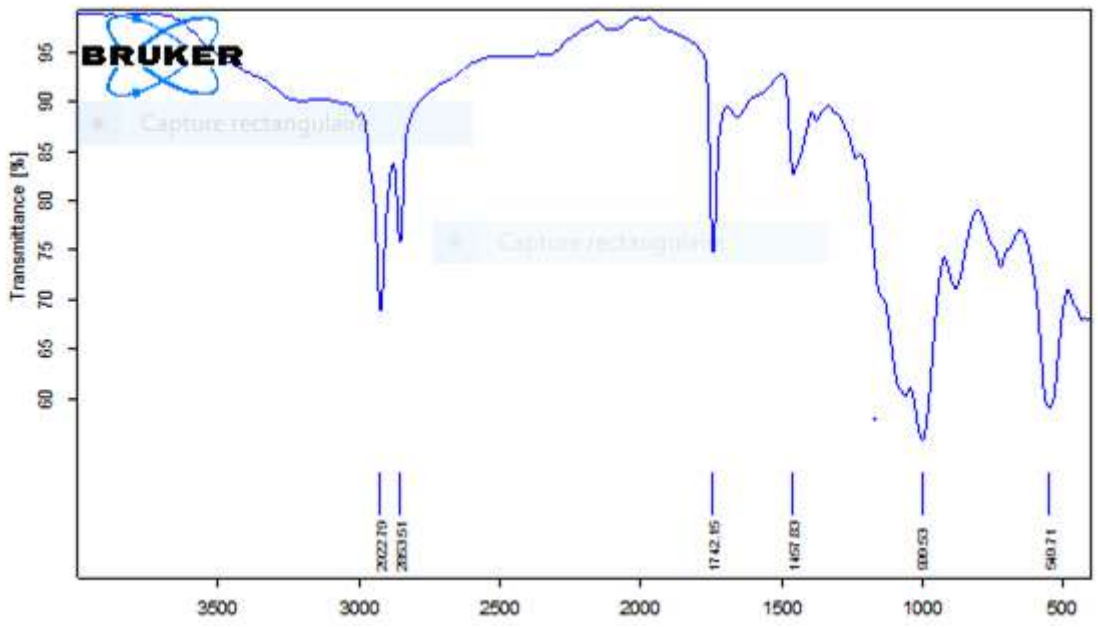



**Figure III-4:** Spectre de IR du biosurfactant de la souche sdk644

❖ **caractérisation structurele de biosurfactant**

Analyse **FTIR** (Fourier Transformed Infra RedSpactroscopy) :

La spactroscopie d'absorbsion d'infrarouge permet de connetre la nature de diffirents groupements chimique présents dans le biosurfactant donc prédir leur structures

La composition moluculair de biosurfactant évaluée par FTIR a révélé la présanse de plusieurs bandes provenant de la contribution des différents groupes fonctionnels appartenant à des lipide, des protienes et d'autre

la bande d'absorption de 549 $cm^{-1}$ ont été assignées à la vibration d'élongation des les laisson C-Br dans les Halogenes.

La bande d'absorption de 999 $cm^{-1}$ résultats des vibration d'étalonages des liaisson C-O dans les Anhydrides RCO-O-COR'.

La bande d'absorbonce située à 1457 $cm^{-1}$ correspond aux vibration d'élongation des liaisons de $CH_3$ dans les Alcanes.

La bande de haute absorbonce située à 1742 $cm^{-1}$ correspond aux vibration d'élongation des liaisons C = O dans les estres ,aldéhydes ou l'acide carboxylique .

L'absorbance dans cette région signifie la présence de groupement carbonyle dans la partie peptidique de la molecule .

Deux bandes à 2853 $cm^{-1}$ et 2922 $cm^{-1}$ sont dues à l'absorption des vibration CH et aux déformation des groupes $CH_2$ et $CH_2$ dans les alcanes .

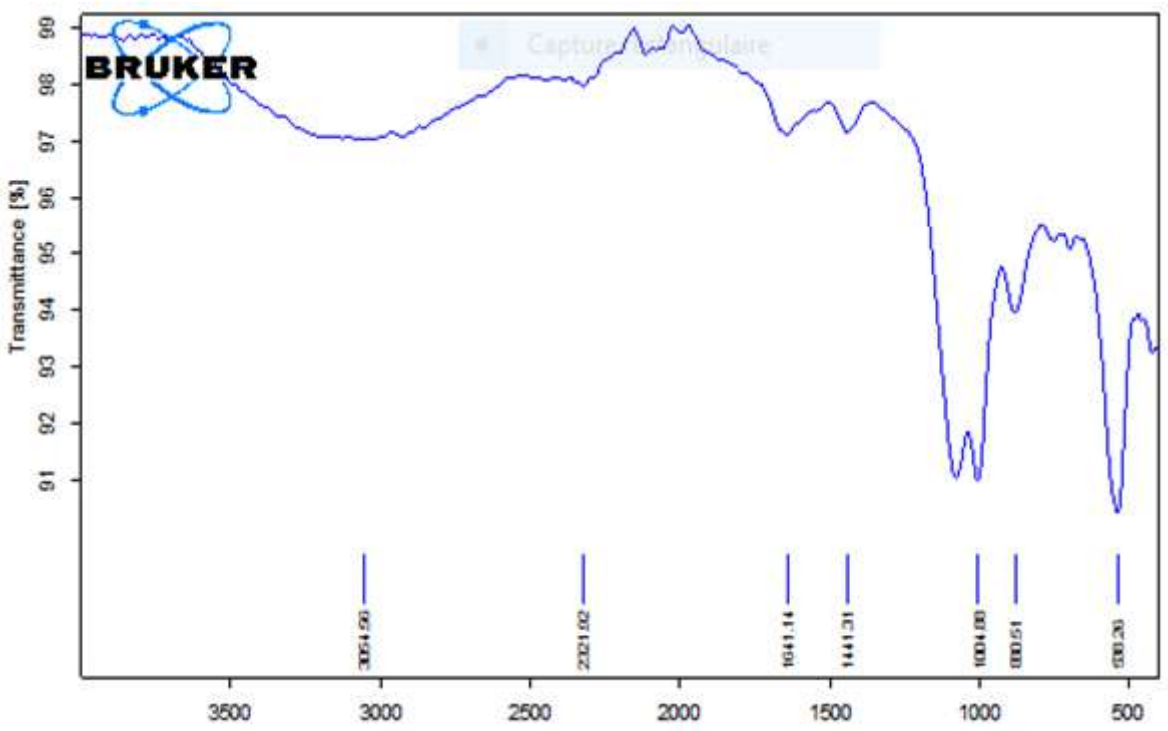



**Figure III-5:** Spectre de IR du biosurfactant de la souche K.P

La bande d'absorption de 538 $cm^{-1}$ résulte des vibration d'élongation des liaison C-l dans les composer halogène.

La bande d'absorption de 880 $cm^{-1}$ sont dues à l'absorption des vibration $RCH=CH_2$ et aux déformation de groupe =C-H .

La bande de 1004 $cm^{-1}$ résulte de vibration d'élongation des liaisons C-O dans les Ethers ROR' en groupes $–CH_2$-O-C.

La bande à 1441 $cm^{-1}$ est dues l'absorption des vibration $CH_2$ dans les alcanes.

La bande à 1641 $cm^{-1}$ résulte de vibration d'élongation des liaison C=C aux déformations C=C-C=C dans les alcanes.

La bande d'absorption de 2321 $Cm^{-1}$ résulte des vibration d'élongation des liaision

S-H dans les composes soufres en groupe RS-H.

La bande d'absorption de 3054 $cm^{-1}$ résulte des vibration d'élongation des liaision

De C-H dans allenes en groupe $–C=C=CH_2$.

# Conclusion Générale

# Conclusion Générale

L'objectif de notre travail était de suivre la production et la caractérisation des biosurfactants en utilisant des souches isolants marinobacter hydrocarbonoclasticus .

La production a été réalisé pendant une 3 jours sur milieu MM additionné de 1% d'huile d'olive avec un suivi de plusieurs paramètres dont : le potentiel d'hydrogène, la densité optique et le test de déplacement d'huile ce qui nous permis de savoir l'évolution de la production du biosurfactants. Certaines souches ont montré une bonne adaptation aux sources de carbone et une forte production de biomasse .

Ce travail a également permis de comparer l'activité biologique des souches . Il a été mis en évidence que nos bactéries semblent développer différentes stratégies pour l'assimilation des substrats carbonés très faiblement solubles dans l'eau comme les huiles olive : une telle observation pourrait trouver des prolongements dans la mise en œuvre de cultures appropriées soit pour la production de biomasse dans le cas des techniques de biorémédiation,ou pour la production de biosurfactants .

Le biosurfactant a été caractérisé par des méthodes physique-chimique indiquant l'indice d'émulsification de la souche (KP) est égale 73% et le DDH 9cm

Alors la souche *klepssila pneumonia* donné la milleur résultat de production de biosurfactant.

Sur le spectre infrarouge du biosurfactant nous allons remerqué les bands de sepectre de souche kp augmente [538-3054]contre le spectre de souche sdk 644[549-2922].

A la lumière des résultats obtenus, il est souhaitable de compléter cette étude par des approches plus approfondies à savoir :

- L'identification des souches étudiées et leur classification et caractérisation..

- L'étude des propriétés physico-chimiques du biosurfactant produit pour mieux connaitre sa nature, sa structure …etc.

- La production du biosurfactant par l'essai d'autres substrats (l'huile d'olive) .

- La réalisation du test d'activité antimicrobienne sur des souches pathogènes.

En fin, il est souhaitable d’exploiter la production de biosurfactant dans des bioréacteurs

à grande échelle, et dans la perspective d’améliorer les rendements de production.

# Référence bibliographie

## Référence bibliographie

**[1] Morelli, J.J., Szajer, G. 2000. Analysis of surfactants**: Part I. Journal of Surfactants and Detergents, 3(4), 539-552. –

**[2]. Banat I.M., Samarah N., Murad M., Horne R & Benerjee S. (1991).** Biosurfactant production and use in oil tank clean-up. World journal of microbiology and biotechnology. 7; pp 80-84.

**[3] Shekhar ,S ,Sundaramanickam, A, Balasubramaian, T.2015.Biosurfactant: producting Microbes and their potential Application** :A Review. Critical Review in Enveronnement Science and Technology.1522-1554.

**[4] Sriram,M I , kalishwaralal , K,Deepak , V , Gracerosepat , R, Srisakthi , K , Gurunathan** ,S, 2011 Biofilm inhibition and antimicrobial action of lipopeptide biosurfactant produced by beavy metal tolerant strain bacillus cereus NK1.Colloids and surfaces B : B iointerfaces **,174.181**

. **[5] Santos,D, Rufino, R ?Luna,J , V , Sarubo , L , 2016**. Biosurfactant Multifunctional Biomolecule of the 21st Century, International Journal of Molecular Science, 401

**[6] Markets and Markets** ,2016 http/www markets and markets . com /Markets :Reports biosurfactant markets-493. Accessed March 8,2018.

**[7].A .Boukhatem et R Aouf** Contribution à l'étude des propriétés anti –oxydative et de l'éfficacité anticorrosive sur l'acier API 5L X52 d'une prodigiosine d'une souche de Serratiamarcescens mimoire de fin d'études,2016.

**[8] P. Pratique, D ,Sabrinathan, S ,Angaiah,A. Rajasekar** " Glycolipide biosurfactant as an eco-Friendly microbial inhibitor for the corrosion of carbon steel in vulnerable corrosive bacterial stains" ,j ournal of Molecular L iquids, Molliq(2017).

**[9] -Al-Arajil., Abd Rahman R.N.Z.R., Basri, Salleh M.A.B. (2007). Minireview**: Microbial Surfactant. (AsPac) J. Mol. Bio. Biotechnol., Vol. 15 No.3, p. 99-105.

**[10] Mimouni (1995).** Sélection des souches bactériennes productrices de biosurfactant à partir de sols contaminés par les hydrocarbures. Rapport d'avancement N°.1 ; pp 1-25.

**[11] Larpent C. (1995).** Tensio-actifs. Techniques de l'ingénieur traité constantes physicochimiques K 342; pp 1-13.

**[12] Rosenberg E.et Ron E.Z.**"High- and low-molecular-mass microbial surfactants", Appl.Microbiol.Biotechnol, 52(1999) 2154 – 162.

**[13] -Pacwa-Płociniczak, M., Płaza, G.A., Poliwoda, A., Piotrowska-Seget, Z. 2014.** Characterization of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing Pseudomonas sp. P-1 strain as a potential tool for bioremediation of petroleum-contaminated soil. Environmental Science and Pollution Research, 21(15), 9385-9395.

**[14] Boateng, J., Catanzano, O. 2015**. Advanced therapeutic dressings for effective wound healing-a review. Journal of pharmaceutical sciences, 104(11), 3653-3680.

**[15] Lang S. et Wullbrandt D. (1996).** Rhamnose-lipids-biosynthesis, Microbiol production and application potentiel. App. Microbiol. Biothechnology. Vol. 51; N°. 1; pp 22-32.

[**16] Marchal,R**.,Penet ,S., Solano-Serena , F. & Vandecasteel J.P.(2003) Gazoline and diesel oïl Biodegradation. Oil & gas Science and Technology **58(**4) : 441-448

[**17**]**Guibet**, J.C. (1997) Carburants et moteurs. *Editions Technip, Paris*, 21-70

**[18]Hancksok,** J., Kovacs, F. & Krar, M. (2004) Production of Vegetable oïl Fatty Acid Methyl Esters from used frying oïl by Combined Acidic/ Alkali transesterification. *Petroleum & coal* **46** (3): 36-44

**[19]Karleskino, A. (1990**) Manuel des Corps Gras –Sous l'égide de l'association française pourl'étude des corps gras: 116-122 et 221- 22

**[20] Fiechter A, (1992)**. Biosurfactants: moving to wards industrial application, Tibtech, 10 : 3- 12.

**[21] Guerra Santos L. H, Kappeli O, Fiechter A, (1986**). Dependence of Pseudomonas aeruginosa contonuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. Appl. Microbiol. Biotechnol., 24 : 443-448.

[**22] Laamari M.R., Benzakour J., Berrekhis F., Derja A., Villemin D.** « Etude de l'‟inhibition de la corrosion du fer en milieu sulfurique 1 M par l'‟acide hexa méthylène diamine tétra méthyle phosphonique », Article (2010)

**[23]. Marcou L. (1989)**. Les applications des agents de surfaces. Dans les phénomènes d'interfaces : Agents de surface, principe et mode d'action. (350 p).

**[24] Laurila M.A. (1985).** Biosurfactants production by mutants of Pseudomonas aeruginosa. Thèse de doctorat. Department of biotechnology, Swiss Federal Instistut of technology Zurich, Switzerland. Pp 1-10 (117 p).

**[ 25] Pore J. (1992).** Les agents de surface. Chapitre. 1. Dans Micro-émulsions, Emulsions multiples, Agents de surface. (270 p).

**[26]. Haigh S.D. (1996)**. A review of the interaction of surfactants with organic contaminants in soil. The Science of the Total Environment, 185: 161-170

**[27] Holmberg, K ,Johson .B .Kromberg .B .Lindmann B** .(2003)( surfactants and Pplymers. In Aqueous Solution) $2^{nd}$ ed.John Wily &Sons.England.

[**28] . Morita, T., et al.**, Isolation of Pseudozyma churashimaensis sp. nov., a novel ustilaginomycetous yeast species as a producer of glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids. Journal of bioscience and bioengineering, 2011. 112(2): p. 137-144.

**[29] Kosaric N., Gray N.C.C., Cairns W.L. (1983).** Microbial Emulsifiers And Deemulsifiers, p. 575-592. In H. J. Rehm and G. Reed (ed.), Biotechnology, Vol. 3. Verlag Chemie, Deerfield Beach, Fla.

**[30] Pennell K.D., Abriola L.M. et Weber W.J. (1993).** Surfactant-enhancement solubilization of residual dodecane in soil columns. 1- Experimental Investigation. Environ. Sci. Technol., 27 (12): 2332-2340.

**[ 31] Pore J. (1992).** Les agents de surface. Chapitre. 1. Dans Micro-émulsions, Emulsions multiples, Agents de surface. (270 p).

**[32] Mc cray J.E., Bai G., Maier R.M. et Brusseau M.L. (2001**). Biosurfactant-enhanced solubilization of NAPL mixtures, J. Contam. Hydrol., 48: 45-68.

**[33] Bai G., Brusseau M. L. et Miller R.M. (1997).** Biosurfactant-enhanced removal of residual hydrocarbon from soil, J. Contam. Hydrol., 25. 157-170.

**[34] Gabet S, (2004).** Remobilisation d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) présents dans les sols contaminés à l'aide d'un tensioactif d'origine biologique. Thèse de doctorat de I’universite de Limoges, spécialité Chimie et Microbiologie de I 'Eau, p.177.

**[35] mémoire de** «  étude de la biodégradation des hydrocarbures pétroliers par des bactéries marines : application en traitement des eaux de mer contaminées par le pétrole » billal zenati, p95 .2018.

**[36] Richard Cl. Et Grimont F. Klebsiella, Enterobacter, Hafnia, Serratia, In** : LE MINOR (L). Bactériologie médicale, Paris : Flammarion, 1992, 427-31p. LECLERC H., Microbiologie générale, 2e édition, 1983, 95p